

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **10232210 A**(43) Date of publication of application: **02.09.98**

(51) Int. Cl.

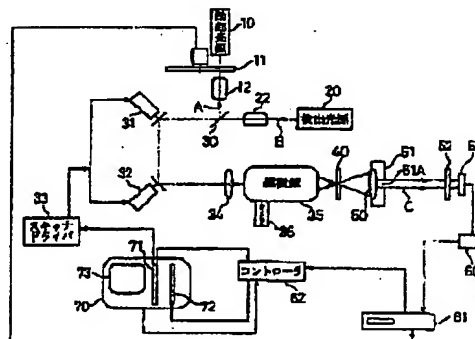
G01N 25/16
G01N 21/41(21) Application number: **09035105**(22) Date of filing: **19.02.97**(71) Applicant: **BUNSHI BIO PHOTONICS**
KENKYUSHO:KK(72) Inventor: **MAKINO TSUYOSHI**
SUGA TAKAYUKI(54) **LIGHT AND HEAT CONVERSION**
SPECTROSCOPIC ANALYZER

COPYRIGHT: (C)1998,JPO

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a light and heat conversion spectroscopic analyzer capable of analyzing a two-dimensional image of a sample shortly.

SOLUTION: An exciting light A emitted from an exciting light source 10 and a detected light B emitted from a detection light source 20 are coaxial by a die chroic mirror 30, and are sequently reflected by scanners 31, 32, and are focused and irradiated on a sample 40 by a microscope 35. The exciting light A and detected light B are scanned two-dimensionally on the sample 40 by the scanners 31, 32 controlled by a scanner driver 33. When the detected light B is focused and irradiated on a thermal lens formed by focusing and irradiation of the exciting light A, the detected light B is radiated by the thermal lens to be a signal light C. The signal light C is focused on an opening part 51A of a pin hole 51 by a focusing lens 50, and passes through the opening part 51A, and is received by a detector 53.



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-232210

(43) 公開日 平成10年(1998) 9月2日

(51) IntCl⁶G 0 1 N 25/16
21/41

識別記号

F I

G 0 1 N 25/16
21/41C
Z

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願平9-35105
(22) 出願日 平成9年(1997) 2月19日

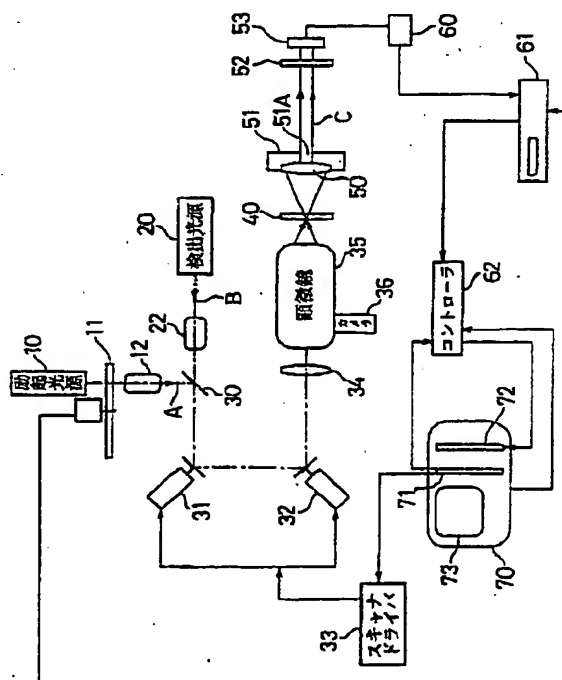
(71) 出願人 595047385
株式会社分子バイオホトニクス研究所
静岡県浜北市平口5000番地
(72) 発明者 牧野 強
静岡県浜北市平口5000番地 株式会社分子
バイオホトニクス研究所内
(72) 発明者 菅 隆之
静岡県浜北市平口5000番地 株式会社分子
バイオホトニクス研究所内
(74) 代理人 弁理士 長谷川 芳樹 (外3名)

(54) 【発明の名称】 光熱変換分光分析装置

(57) 【要約】

【課題】 試料の2次元像を短時間で分析することができる光熱変換分光分析装置を提供する。

【解決手段】 励起光源10から出射された励起光Aおよび検出光源20から出射された検出光Bは、ダイクロイックミラー30により同軸とされ、スキャナ31および32により順次反射され、顕微鏡35により試料40上に集光照射される。励起光Aおよび検出光Bは、スキャナドライバ33により制御されたスキャナ31および32により試料40上を2次元走査される。励起光Aの集光照射により形成された熱レンズに検出光Bが集光照射されると、検出光Bは熱レンズにより発散され、信号光Cとなる。信号光Cは、集光レンズ50によりピンホール51の開口部51Aに集光され、開口部51Aを通過し、フィルタ52を透過して、検出器53により受光される。



(2)

特開平10-232210

【特許請求の範囲】

【請求項1】 励起光が試料に照射されて形成される熱レンズに検出光を入射させ、前記検出光が前記熱レンズにより発散または集光されて出力された信号光に基づいて前記試料の分光分析を行う光熱変換分光分析装置であって、

前記励起光を出力する励起光源と、

前記検出光を出力する検出光源と、

前記励起光および前記検出光を互いに同軸として前記試料に集光照射するとともに、前記試料上の集光位置を走査する照射光学系と、

前記検出光の前記試料への照射に伴って発生する前記信号光を所定点に集光する集光光学系と、

前記所定点に開口部を有するピンホールと、

前記ピンホールの前記開口部を通過した前記信号光を検出する検出器と、

を備えることを特徴とする光熱変換分光分析装置。

【請求項2】 前記励起光および前記検出光それぞれが照射される前記試料上の領域を観察する観察手段を更に備える、ことを特徴とする請求項1記載の光熱変換分光分析装置。

【請求項3】 前記励起光源は、前記試料を2光子励起し得る波長の光を前記励起光として出力する、ことを特徴とする請求項1記載の光熱変換分光分析装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、励起光を試料に照射することにより生じる光熱効果を利用し、検出光を試料に照射して生じた信号光を検出して、これにより試料を分析する光熱変換分光分析技術に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 試料に光を集光照射すると、その試料は、光吸収により局所的に温度上昇し、この温度上昇に応じて屈折率が変化し、熱レンズが形成される。これを光熱効果という。多くの物質では、温度上昇に伴い屈折率は小さくなるので、熱レンズとして凹レンズが形成される。したがって、この凹レンズの中央およびその周辺に光を入射させると、その光は発散または集光する。また、この凹レンズの中央以外の部分に光を入射させると、その光は偏向する。

【0003】 従来より、この光熱効果を利用して試料を分光分析することが行われており、この分析方法を光熱変換分光法という。従来の入射光と透過光との比に基づいて試料分析する吸光法とは異なり、この光熱変換分光法は、熱の拡散すなわち屈折率変化を観察するものである。吸光法に比べて極微量な試料濃度を検出することができる。それ故、光熱変換分光分析技術は、キャピラリー電気泳動装置用の高感度分析装置としての利用や、従来の吸光法の適用が困難な細胞等の生体試料への応用が提案されている。

【0004】 この光熱変換分光分析技術を応用した光熱変換分光分析装置として、「熱レンズ顕微鏡」なるものが知られている（原田明、他、熱レンズ顕微鏡の開発と毛髪計測への応用、色材、第68巻、第10号、pp. 606-612（1995））。図2は、この従来の光熱変換分光分析装置の構成図である。

【0005】 この光熱変換分光分析装置では、励起光源110から出力された励起光は、チョップ111により変調され、ダイクロイックミラー130を透過し、反射鏡131により反射され、顕微鏡135に入射し、この顕微鏡135により試料140に集光照射される。その集光照射された励起光は、試料140上の焦点位置で吸収されて、その照射位置を中心として熱レンズが形成される。試料140に照射された励起光のうち試料140により吸収されなかった光は、試料140を透過するが、フィルタ152により吸収され、検出器153には入射しない。

【0006】 一方、検出光源120から出力された検出光は、ダイクロイックミラー130および反射鏡131それぞれに順次反射され、顕微鏡135に入射し、この顕微鏡135により試料140に集光照射される。顕微鏡135から出射される検出光は、励起光により試料140に形成された熱レンズに集光照射され、試料140を透過して発散または集光する。この試料140から発散または集光して出射された光は信号光となり、その信号光は、集光レンズ150およびフィルタ152を経て検出器153により検出される。

【0007】 この検出器153により検出された信号光の強度は、試料140において形成された熱レンズに応じたものであり、また、チョップ111による励起光変調周期に同期して変化するものである。そこで、この検出器153から出力されプリアンプ160により増幅された信号は、ロックインアンプ161により、チョップ111による励起光変調周期に同期して検波され、そのロックインアンプ161からの出力信号に基づいてコンピュータ170により試料140の分析がなされる。

【0008】 さらに、この光熱変換分光分析装置は、XYZステージ180を有している。このXYZステージ180は、試料140を光軸方向（Z方向）に微動させて焦点調整するとともに、試料140を光軸方向に垂直な平面（XY平面）上で2次元走査するためのものである。そして、コンピュータ170は、XYZステージ180を駆動して試料140をXY平面上で2次元走査するとともに、ロックインアンプ161により同期検波されて出力された信号を入力する。このようにすることにより、この光熱変換分光分析装置は、試料140の2次元像を得ている。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】 上述のように光熱変換分光法は、従来の吸光法に比べれば検出感度が優れてい

(3)

特開平10-232210

るものの、上記従来の光熱変換分光分析装置は、以下のような問題点がある。すなわち、試料140の2次元像を得るために用いているXYZステージ180は、機械的アクチュエータを使用しているため、振動が発生しやすい。この振動は、試料140を分析する上でノイズとなる。この振動によるノイズを排除するには、コンピュータ170は、XYZステージ180により試料140を所定の変位だけ駆動した後に振動が無くなるのを待ってロックインアンプ161からの出力信号を入力する操作を1ステップとして、このステップを試料140上の測定点の数だけ繰り返して行うことも考えられる。しかし、これでは、試料140の2次元像の獲得に時間を要し、実用的ではない。

【0010】本発明は、上記問題点を解消する為になされたものであり、試料の2次元像を短時間で分析することができる光熱変換分光分析装置を提供することを目的とする。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明に係る光熱変換分光分析装置は、励起光が試料に照射されて形成される熱レンズに検出光を入射させ、検出光が熱レンズにより発散または集光されて出力された信号光に基づいて試料の分光分析を行う光熱変換分光分析装置であって、(1) 励起光を出力する励起光源と、(2) 検出光を出力する検出光源と、(3) 励起光および検出光を互いに同軸として試料に集光照射するとともに、試料上の集光位置を走査する照射光学系と、(4) 検出光の試料への照射に伴って発生する信号光を所定点に集光する集光光学系と、(5) 所定点に開口部を有するピンホールと、(6) ピンホールの開口部を通過した信号光を検出する検出器と、を備えることを特徴とする。

【0012】この光熱変換分光分析装置によれば、励起光源から出力された励起光と検出光源から出力された検出光とは、照射光学系により、互いに同軸とされて試料に集光照射されるとともに、試料上の集光位置が走査される。励起光が試料に集光照射されると熱レンズが形成され、検出光がその熱レンズに入射すると、信号光が発生する。この信号光は、集光光学系によりピンホールの開口部に集光されて、その開口部を通過し、検出器により検出される。

【0013】また、さらに、励起光および検出光それぞれが照射される試料上の領域を観察する観察手段を更に備えることを特徴とする。この場合には、観察手段により、照射光学系により励起光および検出光が集光照射されるべき試料上の領域を確認することができ、また、集光照射の状況を確認することにより照射光学系を調整することができる。

【0014】また、さらに、励起光源は、試料を2光子励起し得る波長の光を励起光として出力することを特徴とする。この場合には、試料中の光軸方向のごく限られ

た領域にのみが励起されるので、優れた分解能で試料を分析することができる。

【0015】

【発明の実施の形態】以下、添付図面を参照して本発明の実施の形態を詳細に説明する。尚、図面の説明において同一の要素には同一の符号を付し、重複する説明を省略する。図1は、本発明に係る光熱変換分光分析装置の構成図である。

【0016】励起光源10は、試料40に熱レンズを形成するための励起光Aを出力するものである。励起光源10として、指向性に優れピーク強度が高いレーザ光源が好適に用いられ、例えば、フェムト秒パルス光を出力するチタンサファイアレーザ光源（波長715nm、繰り返し周波数76MHz、パルス幅130fs）や、モードロックレーザ光励起の色素レーザ光源が用いられる。この励起光源10から出力された励起光Aは、チョップパ11により強度変調され、ビームエキスパンダ12により光束径が調整され、ダイクロイックミラー30、スキャナ31および32により順次反射され、瞳投影レンズ34を経て、顕微鏡35に入射する。

【0017】一方、検出光源20は、試料40に形成された熱レンズに照射すべき検出光Bを出力するものである。検出光源20として、同様にレーザ光源が好適に用いられ、例えば、He-Neレーザ光源が用いられる。この検出光源20から出力された検出光Bは、ビームエキスパンダ22により光束径が調整され、ダイクロイックミラー30を透過し、スキャナ31および32により順次反射され、瞳投影レンズ34を経て、顕微鏡35に入射する。

【0018】ここで、チョップパ11は、励起光Aを周期的に透過／遮断の変調をする。ビームエキスパンダ12および22それぞれは、励起光Aおよび検出光Bそれぞれの試料40上での光軸方向集光位置の相対的位置関係を調整して、感度調整等するためにも使用される。ダイクロイックミラー30は、励起光Aを反射させるとともに、検出光Bを透過させ、また、反射した励起光Aおよび透過した検出光Bを互いに略同軸にして出力する。

【0019】また、スキャナ31および32それぞれは、スキャナドライバ33による制御に従い反射面の傾きが設定され、これにより、ダイクロイックミラー30から到達した励起光Aおよび検出光Bの反射方向を調整する。このスキャナ31および32として、例えば、1対のガルバノメータミラー、ガルバノメータミラーとポリゴンミラーとの組合せ、ガルバノメータミラーとレゾナントミラーとの組合せ、ガルバノメータミラーとAOD (Acoust-Optical Deflector) との組合せ、等が好適である。

【0020】また、顕微鏡35は、励起光Aおよび検出光Bそれぞれを試料40上に集光照射するものであり、カメラ36を備えている。このカメラ36は、試料40

(4)

特開平 10-232210

自体だけでなく、試料 40 上の励起光 A および検出光 B の照射位置および集光状態を確認するものである。したがって、分光分析に先だって試料 40 の配置を決定するとともに、励起光 A および検出光 B が試料 40 に照射される位置および集光状態を確認しながら光熱変換分光分析を行うことができる。

【0021】顕微鏡 35 から出射された励起光 A は、試料 40 に集光照射される。その励起光 A の一部は試料 40 により吸収され、残部は透過する。試料 40 では、励起光吸収に伴い、励起光 A が照射された位置を中心に温度が上昇し熱レンズが形成される。励起光 A がチョッパ 11 により変調されているので、この熱レンズも励起光 A の変調周期と同一周期で変調されたものとなる。

【0022】同様に、顕微鏡 35 から出射された検出光 B は、試料 40 に熱レンズが形成されている領域に照射される。そして、検出光 B が試料 40 に入射すると、試料 40 に形成された熱レンズにより検出光 B は発散または集光し信号光 C として出射する。この信号光 C の強度は、その発散または集光の度合い、即ち、熱レンズの形成度合いを示すものであり、更には、励起光 A が集光照射された位置における試料 40 の濃度等を示すものである。

【0023】試料 40 から発生した信号光 C は、集光レンズ 50、ピンホール 51 およびフィルタ 52 を順次経て、検出器 53 により検出される。ここで、集光レンズ 50 およびピンホール 51 は、集光レンズ 50 の前側焦点位置が検出光 B の試料 40 上の集光位置に一致し、且つ、後側焦点位置がピンホール 51 の開口部 51A に一致するように配置される。したがって、集光レンズ 50 は、試料 40 から発生した信号光 C を入力し、その信号光 C をピンホール 51 の開口部 51A に集光する。また、フィルタ 52 は、ピンホール 51 の開口部 51A を通過した信号光 C を透過させるが、試料 40 を透過し更に開口部 51A を通過した励起光 A を反射または吸収する。検出器 53 は、フィルタ 52 を透過した信号光 C を検出して、信号光強度に応じた電流信号を出力する。

【0024】なお、瞳投影レンズ 34、顕微鏡 35、集光レンズ 50、ピンホール 51、フィルタ 52 および検出器 53 からなる光学系は、本装置により試料 40 を分光分析している間は固定配置されているものである。また、試料 40 も、分光分析中は位置固定されたままであり、走査されることはない。

【0025】検出器 53 から出力された電流信号を入力するプリアンプ 60 は、その電流信号を電圧信号に変換し増幅して出力する。そして、ロックインプリアンプ 61 は、プリアンプ 60 から出力された電圧信号を入力するとともに、チョッパ 11 による励起光変調の同期信号をも入力して、プリアンプ 60 からの電圧信号を同期検波する。このロックインプリアンプ 61 からの出力信号は、コントローラ 62 を経て、コンピュータ 70 に入力す

る。

【0026】コンピュータ 70 は、スキャンコントローラ 71 およびフレームグラバ 72 を有し、スキャナドライバ 33 およびコントローラ 62 に接続されている。スキャンコントローラ 71 は、鋸波信号を発生し、その鋸波信号をスキャナドライバ 33 に送り、スキャナドライバ 33 は、その鋸波信号に基づいて、スキャナ 31 および 32 それぞれを駆動制御し、試料 40 上の励起光 A および検出光 B の照射位置を 2 次元走査する。同時に、スキャンコントローラ 71 は、その鋸波信号をコントローラ 62 にも送り、コントローラ 62 は、入力したロックインアンプ 61 からの出力信号を鋸波信号に同期してサンプリングしホールドする。また、フレームグラバ 72 は、コントローラ 62 によりサンプリングされホールドされた信号を入力し、試料 40 上の励起光 A および検出光 B の照射位置に対応付けて、その信号を記憶する。そして、コンピュータ 70 は、フレームグラバ 72 に記憶された試料 40 の 2 次元像を、そのまま或いは画像処理して表示部 73 に表示する。

【0027】本実施形態に係る光熱変換分光分析装置は以上のように構成されているので、以下のように作用する。すなわち、励起光源 10 から出射された励起光 A は、チョッパ 11 により強度変調され、ビームエクスパンダ 12 により光束径が調整され、ダイクロイックミラー 30 により反射される。一方、検出光源 20 から出射された検出光 B は、ビームエクスパンダ 22 により光束径が調整され、ダイクロイックミラー 30 を透過する。ダイクロイックミラー 30 で反射された励起光 A および透過した検出光 B は、同軸とされ、スキャナ 31 および 32 により順次反射され、瞳投影レンズ 34 を経て顕微鏡 35 に入射し、顕微鏡 35 により試料 40 上に集光照射される。このとき、励起光 A および検出光 B は、スキャナドライバ 33 により制御されたスキャナ 31 および 32 により、試料 40 上を 2 次元走査される。

【0028】試料 40 上に励起光 A が集光照射されると、その位置を中心に熱レンズが形成され、また、その熱レンズに検出光 B が集光照射されると、その検出光 B は熱レンズにより発散または集光され、その光線は信号光 C となる。この信号光 C は、集光レンズ 50 によりピンホール 51 の開口部 51A に集光されて、その開口部 51A を通過し、フィルタ 52 を透過して、検出器 53 により受光される。信号光 C を受光した検出器 53 から出力される電流信号は、プリアンプ 60 により電圧信号に変換され、その電圧信号は、ロックインアンプ 60 により、チョッパ 11 における励起光 A の変調に同期して検波される。

【0029】このロックインアンプ 61 から出力される信号は、信号光 C の強度に応じたものであり、試料 40 における熱レンズの形成度合いに応じたものであり、さらには、励起光 A が集光照射された位置における試料 4

0の濃度等を示すものである。そして、ロックインアンプ61から出力された信号は、スキャナドライバ33を介してスキャナ31および32をも制御するスキャンコントローラ71による指示により、コントローラ62を介してコンピュータ70に入力され、試料40上の励起光Aおよび検出光Bの照射位置に対応付けられてフレームグラバ72に記憶される。このようにして、試料40の2次元像は、フレームグラバ72に記憶され、表示部73に表示される。

【0030】以上のように、本実施形態に係る光熱変換分光分析装置によれば、試料40を走査することなく位置固定し、スキャナ31および32を用いて励起光Aおよび検出光Bを試料40上で走査することにしたので、従来の振動の問題を解消することができ、したがって、短時間で試料40を光熱変換分光分析することができる。また、試料40で発生した信号光Cを集光レンズ50によりピンホール51の開口部51Aの位置に集光することにしたので、試料40上の検出光Bの照射位置すなわち信号光Cの発生位置に依らず、同一条件で信号光Cを検出することができ、試料40の2次元像を得ることができる。

【0031】また、本実施形態に係る光熱変換分光分析装置によれば、顕微鏡35を用いて励起光Aを試料40上に集光照射することにしたので、励起光Aの集光領域は極めて微小な領域となり、その集光領域では励起光Aは極めて高い強度になる。このように励起光Aの強度が高い領域においては、2光子励起が起こる確率が高い。一般に、2光子励起は、或波長の1個の光子を吸収して励起される分子が、その倍の波長の2個の光子を同時に吸収することにより励起されることであり、この2光子励起の起こる確率は、光強度の2乗に比例する。したがって、試料40上において2光子励起が起こる確率が高くなる領域は、焦点近傍の極めて限られた微小な領域となる。

【0032】このように2光子励起を採用すれば、試料40上の焦点近傍の極めて微小な領域のみが励起されることから、光軸に垂直な方向だけでなく、光軸方向にも優れた分解能で試料40を分析することができる。また、紫外域や可視域に吸収を有する分子を、赤外域の励起光により励起することができ、例えば、励起光源10として、大出力の近赤外レーザ光を出射し得るYAGレーザ光源等を使用することができる。また、2光子励起を採用することにより、光学系由来のバックグラウンドを低減することができ、検出感度を向上させることができる。さらに、試料40が蛍光色素を標識としたものである場合、2光子励起が焦点位置のみで起こることから、その他の部分では光褪色が起こらず、試料40全体

としての光褪色を少なく抑えることができる。

【0033】

【発明の効果】以上、詳細に説明したとおり本発明によれば、励起光源から出力された励起光と検出光源から出力された検出光とは、照射光学系により、互いに同軸とされて試料に集光照射されるとともに、試料上の集光位置が走査される。励起光が試料に集光照射されると熱レンズが形成され、検出光がその熱レンズに入射すると、信号光が発生する。この信号光は、集光光学系によりピンホールの開口部に集光されて、その開口部を通過し、検出器により検出される。

【0034】以上のように、試料を走査することなく位置固定し、励起光および検出光を試料上で走査することにしたので、従来の振動の問題を解消することができ、したがって、短時間で試料を光熱変換分光分析することができる。また、試料で発生した信号光を集光光学系によりピンホールの開口部の位置に集光することにしたので、試料上の検出光の照射位置すなわち信号光の発生位置に依らず、同一条件で信号光を検出することができ、試料の2次元像を得ることができる。

【0035】また、励起光および検出光それぞれが照射される試料上の領域を観察する観察手段を更に備える場合には、照射光学系により励起光および検出光が集光照射されるべき試料上の領域を確認することができ、また、集光照射の状況を確認することにより照射光学系を調整することができる。

【0036】また、試料を2光子励起し得る波長の光を励起光として用いる場合には、試料中の光軸方向のごく限られた領域にのみが励起されるので優れた分解能で試料を分析することができ、検出感度が向上し、また、光褪色の問題が低減される。

【図面の簡単な説明】

【図1】本実施形態に係る光熱変換分光分析装置の構成図である。

【図2】従来の光熱変換分光分析装置の構成図である。

【符号の説明】

10…励起光源、11…チョップパ、12…ビームエキスパンダ、20…検出光源、22…ビームエキスパンダ、30…ダイクロイックミラー、31、32…スキャナ、33…スキャナドライバ、34…瞳投影レンズ、35…顕微鏡、36…カメラ、40…試料、50…集光レンズ、51…ピンホール、52…フィルタ、53…検出器、60…プリアンプ、61…ロックインアンプ、62…コントローラ、70…コンピュータ、71…スキャンコントローラ、72…フレームグラバ、73…表示部、A…励起光、B…検出光、C…信号光。

特開平 10-232210